

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta elektrotechniky
a komunikačních technologií

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH TECHNOLOGIÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION

ÚSTAV VÝKONOVÉ ELEKTROTECHNIKY A ELEKTRONIKY

DEPARTMENT OF POWER ELECTRICAL AND ELECTRONIC ENGINEERING

SYSTÉM PRO ELEKTROPORACI BUNĚK STŘÍDAVÝM NAPĚTÍM

SYSTEM WITH AC GENERATOR FOR CELL ELECTROPORATION

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Petr Lukoianov

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Dalibor Červinka, Ph.D.

BRNO 2019



Bakalářská práce

bakalářský studijní obor **Silnoproudá elektrotechnika a elektroenergetika**

Ústav výkonové elektrotechniky a elektroniky

Student: Petr Lukoianov

ID: 186132

Ročník: 3

Akademický rok: 2018/19

NÁZEV TÉMATU:

System pro elektroporaci buněk střídavým napětím

POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

1. Fyzicky realizujte úpravy elektroporačního generátoru diskutované v semestrálním projektu.
2. Zařízení oživte a proveďte zatěžovací zkoušky přístroje.
3. Zpracujte přehledný návod k použití.

DOPORUČENÁ LITERATURA:

- [1] PATOCKA, Miroslav. Magnetické jevy a obvody ve výkonové elektronice, měřicí technice a silnoproudé elektrotechnice. 1. vyd. V Brně: VUTUM, 2011, 564 s. ISBN 978-80-214-4003-6.
- [2] Vorel P., Patocka M., Průmyslová elektronika, Vydání 1., skriptum FEKT VUT Brno, 2007
- [3] SKALICKÝ, J. Navrhování elektrických pohonů. Navrhování elektrických pohonů. Brno: VUT FEKT, 2002.

Termín zadání: 4.2.2019

Termín odevzdání: 22.5.2019

Vedoucí práce: Ing. Dalibor Červinka, Ph.D.

Konzultant:

doc. Ing. Petr Toman, Ph.D.
předseda oborové rady

UPOZORNĚNÍ:

Autor bakalářské práce nesmí při vytváření bakalářské práce porušit autorská práva třetích osob, zejména nesmí zasahovat nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a musí si být plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č.40/2009 Sb.

Abstrakt

Táto bakalárská práca sa zaoberá systémom pro elektroporace buněk střídavým napětím. V první kapitole jsou popsány biofyzikální mechanismy metody. V druhé kapitole jsou popsány různé typy zařízení. V třetí kapitole je rozebrána konstrukce a pracovní princip přístroje, také je prozkoumána logika řídicího obvodu a uveden návod k použití přístroje.

Klíčová slova

Elektroporace, elektroporátor, EKG, zdroj pulzů, měnič.

Abstract

This bachelor thesis is observing a system with AC generator for cell electroporation. The first paragraph keeps an eye on description of methodology of biophysics mechanisms. In the 2nd part several kinds of devices were described. In the last paragraph you can see a non-assembled construction and operating principle of the device. Apart from that the control circuit logic explored and device manual is included.

Keywords

Electroporation, electroporator, ECG, pulse source, inverter.

Bibliografická citace:

LUKOIANOV, Petr. Systém pro elektroporaci buněk střídavým napětím. Brno, 2019. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/117520>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, Ústav výkonové elektrotechniky a elektroniky. Vedoucí práce Dalibor Červinka

Prohlášení

„Prohlašuji, že svou diplomovou (bakalářskou) práci na téma Systém pro elektroporaci buněk střídavým napětím jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucí/ho diplomové (bakalářské) práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autor uvedené diplomové (bakalářské) práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této diplomové (bakalářské) práce jsem neporušil autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhl nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a jsem si plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č. 40/2009 Sb.

V Brně dne: 23 května 2019

.....

podpis autora

Poděkování

Chtěl bych *poděkovat* Ing. Daliboru Červinkovi, Ph.D.. vedoucímu mé bakalářské práce za cenné rady a trpělivost při vedení mé semestrální práce.

V Brně dne: 23 května 2019

.....

podpis autora

Obsah

Seznam obrázků	12
Úvod.....	13
1 Biofyzikální mechanismy metody.....	14
1.1 Účinky elektroporace a parametry impulzů	14
1.2 Vratná elektroporace	16
1.3 Nevratná elektroporace	17
1.3.1 NanoKnife®IRE	18
1.4 Buněčná membrána jako dielektrikum.....	20
1.5 Současný znalosti o elektroporace	21
2 Elektroporační zařízení—Současný stav techniky.....	22
2.1 Laboratorní zařízení pro elektroporaci a sonoporaci buněčných kultur.....	22
2.2 Zařízení pro elektroporaci buněk Ruské akademie věd	23
2.2.1 Stručný popis přístroje	24
3 Systém pro elektroporaci buněk střídavým napětím.....	26
3.1 Pracovní principy a konstrukce systému.....	27
3.2 Řídicí jednotka	28
3.2.1 Generátor periody pulsu.....	30
3.2.2 Synchronizace s EKG a zobrazení intervalu mezi řídicím impulsem a elektroporačním impulsem.	31
3.2.3 Generátor délky pulzu.....	32
3.2.4 Klopný obvod D, nadproudová ochrana a měření proudu.....	34
3.2.5 Generátor periody vysokofrekvenčního napětí.....	36
3.3 Návod k použití	38
Závěr	39
Literatura.....	40

Seznam obrázků

Obr. 1-1 Elektroporační účinky [5].....	15
Obr. 1-2 Princip elektroporace.....	16
Obr. 1-3 Systém NanoKnife IRE	18
Obr. 1-4 Jehlová sonda.....	18
Obr. 1-5 Nevratná elektroporace [4].....	19
Obr.2-1 Laboratorní zařízení [2].....	23
Obr. 2-2 Elektroporátor [2].....	24
Obr. 2-3 Bloková schéma elektroporátora.....	24
Obr. 3-1 Bloková schéma.....	27
Obr. 3-2 Řídicí deska ююю.....	29
Obr. 3-3 Bloková schémata řídicí desky	29
Obr. 3-4 Generátor periody pulsu	30
Obr. 3-5 Obvod pro synchronizace s EKG	31
Obr. 3-6 Generátor délky pulsu	32
Obr. 3-7 Impulsy na vstupech 8-9 klopného obvodu IC3C	33
Obr. 3-8 Průběh vstupního a blokovacího signálů	34
Obr. 3-9 Klopný obvod D.....	34
Obr. 3-10 Nadproudová ochrana.....	35
Obr. 3-11 Generátorem periody vysokofrekvenčního napětí a zesilovač signálu.....	36
Obr. 3-12 Výstupní impulsy ze zesilovače signálu.....	37
Obr. 3-13 Výstupní impulsy na vývodech LSP19-20.....	37
Obr. 3-14 Průběh elektroporačního impulsu	38

ÚVOD

Energie fyzikálních faktorů byla již dlouho úspěšně aplikována v různých oblastech lékařské praxe. Zvláštní místo mezi nimi zaujímá fyzioterapie - využití fyzikálních faktorů pro terapeutické, profylaktické a rehabilitační účely. Moderní medicína je aktivně využívá v řadě nových metod a technologií, které jsou hraniční pro klasickou fyzioterapii. Tyto metody zahrnují především:

- a) terapie rázovou vlnou - metoda extrakorporálních účinků na tkáň těla s akustickými impulsy se značnou amplitudou nebo rázovými vlnami;
- b) metody založené na využití energie fyzikálních faktorů (ultrazvuk, magnetické pole, elektrické pole, světlo apod.) k vytvoření pórů v buněčné membráně, které zvyšují její propustnost pro různé látky.

Hlavní charakteristikou prezentovaných metod je použití fyzikálních faktorů s mnohem větší silou než ve fyzioterapii.

V posledních letech byla velmi aktivně vyvinuta elektroporace, která může být považována za zvláštní druh léčivé elektroforézy. Použití pulzních elektrických polí v biotechnologii a lékařství vedly k novým metodám v léčbě rakoviny, genové terapie, dodání léků a netermické inaktivace mikroorganismy. Hlavním cílem těchto metod je vytvářet v buněčné membráně otevření pórů dostatečné velikosti, aby bylo zajištěno přijetí nezbytných látek uvnitř buňky. Tyto látky, v závislosti na cíli, mohou zabíjet buňku nebo obnovit její životaschopnost. V závislosti na délce trvání impulsu a velikosti elektrického pole adekvátně působí na buňky.

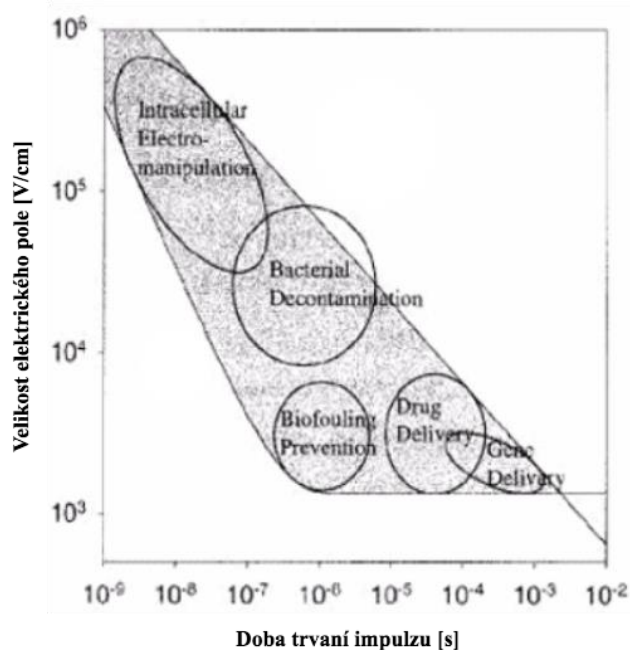
Na Ústavu výkonové elektrotechniky a elektroniky, Fakulty elektrotechniky a komunikačních technologií Vysokého učení technického v Brně probíhá vývoj vysokonapěťových impulzních zdrojů pro tyto účely. Zdroj pro střídavou elektroporaci již byl v minulosti vytvořen a vyzkoušen.

1 BIOFYZIKÁLNÍ MECHANISMY METODY

Elektroporace - tvorba pórů v biologických objektech (buněčné membrány, kůže apod.) působením vysoko intenzivního krátkodobého elektrického pole. Původně se jednalo pouze o buněčné membrány a dnes je metoda rozšířena na mnoho tkání, především na kůži. Změny vlastností buněčné membrány působením elektrického pole jsou způsobeny zvláštnostmi chování lipidové dvojvrstvy [1]. Předpokládáme následující sled událostí pod působením impulzního elektrického pole: primární konformační změny lipidové dvojvrstvy (narušení orientace dipólů), zvýšení stávajícího a vzhledu nových hydrofobních pórů, jejich vývoj do stabilnějších sekundárních hydrofilních pórů [2]. Velikosti hydrofilních pórů se mění s časem v závislosti na síle a době trvání elektrického účinku, který určuje následný průběh membrány a celku jako celku: buď "utažením" pórů a obnovením původní (nízké) propustnosti buněčné membrány, nebo nevratnými změnami až do smrti buněk.

1.1 Účinky elektroporace a parametry impulzů

Pro tvorbu pórů je nutné, aby parametry použitého elektrického pole překročily prahové hodnoty, které se mezi jednotlivými buňkami značně liší. Typicky se prahová hodnota pro destabilizaci buněčné membrány zvyšuje s klesajícím poloměrem buňky. Proto elektroporace bakteriálních buněk vyžaduje větší intenzitu elektrického pole, než je nezbytné pro zvýšení propustnosti savčích buněk. V závislosti na typu buněk a velikosti molekul, které je třeba dodat do buňky, může být rozmezí intenzity pole od 100 V / cm do několika tisíc a trvání impulzu se pohybuje od 100 μ s do 10 ms. Pro přivádění léčiv do lidských buněk a všech savců jsou pole 1000 V / cm a trvání impulsu 100 μ s poměrně účinné, zatímco pro přenos genů jsou vyžadována pole s nižší intenzitou, ale delší impulsy [3]. (Obr. 1-1)



Obr. 1-1 Elektroporační účinky [5]

Při studiu účinku elektrického pole, například na membránách erytrocytů, bylo zjištěno, že všechny pulzy způsobují jejich elektroporaci, jejíž prahová hodnota nezávisí na formě impulzu. Při použití dvou impulzů je pozorována neadditivita rychlosti poklesu počtu erytrocytů v důsledku elektroporace: dva bipolární stimuly způsobily větší účinek ve srovnání se dvěma unipolárními stimuly [4]. Různí autoři prokázali, že kromě dozimetrických parametrů elektrického pole ovlivňují faktory jako velikost a tvar buněk, tloušťka a vodivost membrány, stejně jako mechanické namáhání na elektroporaci [5].

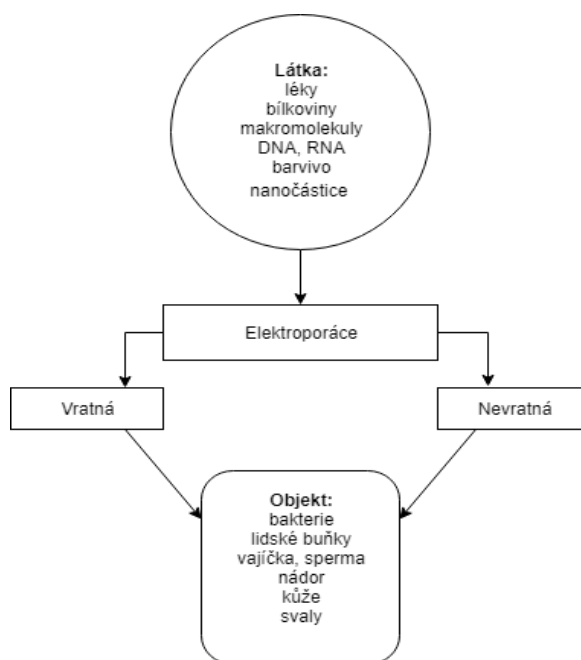
Při elektroporaci je primárním biofyzikálním procesem indukce transmembránového potenciálu impulsem vnějšího elektrického pole následovaným rozpadem membrány a tvorbou lipidových pórů. Podle V.F. Antonova, pokud jde o propustnost, lipidové póry se zásadně liší od proteinových kanálů podle jejich původu a výjimečné dynamiky. Zatímco proteinové kanály mají striktně definované rozměry, které přetrvávají po celou dobu života buňky, velikost lipidových pórů v procesu vzlínání se značně liší [6]. Tato variabilita však má omezení. Je-li poloměr pórů menší než kritický, pak by měl v procesu odbočení projít všemi mezistěnami a dosáhnout minima. Předpokládá se, že úplné utažení lipidových pórů je brzděno silnými

hydratačními silami, které se projevují, když se stěny hydrofilních pórů navzájem přibližují.

Lipidové póry, na rozdíl od kanálů proteinových iontů, nemají výraznou selektivitu, která koreluje s jejich poměrně velkými počátečními rozměry (poloměr až 4 nm). Póry lipidů mohou buňka používat pro přepravu vysokomolekulárních látek, iontů a molekul vody.

1.2 Vratná elektroporace

Na rozdíl od pevného dielektrika mohou póry v membránách živých tkání rychle (přibližně 30 s) zmizet po zastavení působení pulzního elektrického pole bez zbytkových změn počáteční permeability buněk. Při reverzibilní elektroporaci mohou buňky přežít proces zvyšující se propustnosti, který může být použit k přivádění různých chemických a biologických složek do buňky. Prostřednictvím otvorů vytvořených během elektroporace mohou volně pronikat molekuly různých chemických sloučenin, léků a biologicky aktivních látek, které normálně nejsou schopné nebo slabě procházet membránou buněčného povrchu. Účinek reverzibilní elektroporace se používá v biotechnologickém výzkumu, genové terapii a aktivní elektro farmakoterapii. (Obr. 1-2)



Obr. 1-2 Princip elektroporace

1.3 Nevratná elektroporace

S nevratnou elektroporací se aplikuje silné vnější elektrické pole. Jeho účinek na buňky vede ke zvýšení transmembránového potenciálu a indukuje tvorbu pórů v membráně. Tvorba propustných pórů je možná až po dosažení kritické prahové úrovně, která závisí na typu buňky a je obvykle v rozmezí 200–300 mV / cm. Výkon pulsu a jeho trvání, překračující prahovou úroveň buněčného odporu membrány vedou k tvorbě více nanoporů, které pod vlivem elektrického pole zůstávají neustále otevřené. Tyto změny vedou k buněčné smrti kvůli neschopnosti membrány vrátit se do původního homeostatického stavu.

Buňky jsou pevně organizovány bilipidovými plazmatickými membránami, které regulují intracelulární a extracelulární transport solutů. Okolo buňky se šíří vnější elektrické pole a ne přes něj. To vytváří rozdíl v proudové hustotě na povrchu buňky a uvnitř ní a vede k výskytu potenciálního rozdílu na membráně. Když transmembránový potenciál dosáhne určité kritické úrovně, buňka se stává nestabilní a plazmatická membrána podléhá destrukci nebo restrukturalizaci s tvorbou nanoporů, což poskytuje pasivní tok vstupních iontů. Vzhledem k tomu, že se membrána stala propustnou, zvyšují se energetické nároky v buňce, aby se zachoval rozdíl v transmembránech koncentrace iontů. Vodivost plazmatické membrány se dramaticky zvyšuje a pokud nejsou iontové pumpy závislé na ATP schopny kompenzovat difúzi iontů přes póry v plazmatické membráně, dochází k úbytku energie a zastavení biochemických procesů, vedoucích k buněčné smrti. Nevratně poškozené buňky jsou eliminovány imunitním systémem. Řada autorů ukázala, že ultrakrátký (více než 100 nanosekund) pulsy s vysokou intenzitou (200–300 kV / cm) přímo ovlivňují intracelulární orgány bez nevratného poškození buněčných membrán. Současně je buněčná smrt způsobena apoptózou indukovanou mitochondriemi, která je spojena s uvolňováním vápníku z endoplazmatického retikula a poškození DNA.

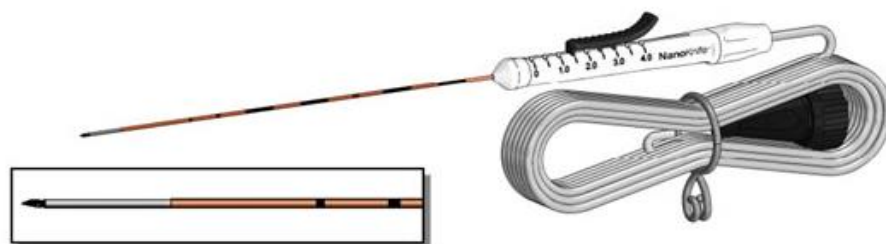
1.3.1 NanoKnife®IRE

NanoKnife je první zařízení na světě, které používá nevratnou elektroporaci IRE(irreversible electroporation). Je to účinná, ale zároveň šetrící miniinvazivní technika, která umožňuje bodovou a cílenou destrukci (ablaci) nádoru nebo rakoviny krátkými elektrickými a vysokonapětovými pulsy.



Obr.1-3 Systém NanoKnife IRE

Systém NanoKnife IRE používá elektrické impulsy s napětím do 3000 V, které jsou napájeny několika jehlovými sondami (obr1-4) umístěnými uvnitř a / nebo kolem ablační zóny pod ultrazvukovým vedením(obr1-5). Pod vlivem vysokonapětových proudových impulsů se na membrány maligních buněk aplikuje nevratné poškození. Buňky umírají a produkty rozpadu jsou odstraněny lymfatickým systémem jako výsledek makrofágové reakce. Procedura se provádí v celkové anestezii a vyžaduje svalovou relaxaci.



Obr. 1-4 jehlová sonda

Když se elektroporace provádí pomocí NanoKnife, krevní cévy, kanály a stromální struktury, jak uvnitř, tak v blízkosti ablační zóny, nejsou poškozeny, což potvrzují provedené studie.

Nevratná elektroporace (IRE) se liší od jiných způsobů ablace, které používají vystavení extrémně vysokým nebo nízkým teplotám. Radikální rozdíl při použití systému NanoKnife IRE spočívá v absenci problému odvodu tepla. K odstranění produktů destrukce buněk dochází v důsledku přirozených procesů během několika týdnů (imitace přirozené smrti buňky).

Výhody metody:

- Netepelné působení.
- Kritické struktury (cévy, nervy a kanály) nejsou ovlivněny.
- Odstranění produktů destrukce buněk v důsledku přirozených procesů těla během několika týdnů.



Obr. 1-5 nevratná elektroporace [4]

1.4 Buněčná membrána jako dielektrikum

Elektroporace je důsledkem elektrického průrazu membrány, podobně jako při průrazu dielektrika. Při určité kritické hodnotě intenzity elektrického pole dochází k průrazu dielektrika. V tomto případě proud proudí systémem kanálů vytvořených v dielektriku. Dielektrikum v elektrickém poli je v mechanicky namáhaném stavu, protože spojení mezi nabitými částicemi látky neutralizuje síly působící vnější pole. Jak se zvyšuje intenzita vnějšího elektrického pole, zvyšuje se také intenzita mechanického namáhání uvnitř dielektrika, což také vede k tvorbě pórů. V dielektrikách přispívají ke průrazu nehomogenity, protože v místech nehomogenity se síla elektrického pole může zvýšit.

Na rozdíl od obvyklého dielektrika je buněčná membrána zpočátku charakterizována výrazným nehomogenním elektrickým stavem. Elektrické vlastnosti membrány jsou z velké části určovány strukturální asymetrií. Distribuce lipidů na vnitřním a vnějším povrchu membrány je asymetrická. Orientované dipóly každé monovrstvy membrány vytvářejí ve středu fosfolipidové dvojvrstvy potenciál přibližně 240 mV s pozitivním nábojem uvnitř [7].

Povrch většiny biomembrán je záporně nabitý: obvykle 10-20% membránových lipidů je ve formě aniontů. Jiné membránové komponenty, jako jsou proteiny, mají negativní náboj. Aniontové skupiny jsou fixovány na povrchu membrány a jejich náboj je neutralizován proti ionty, jejichž koncentrace se mění v objemu vodné fáze. Proti ionty nejsou lokalizovány na povrchu membrány, ale v určité vzdálenosti od ní vytvářejí takzvanou dvojistou difuzní vrstvu. Nerovná koncentrace iontů uvnitř i vně buňky, stejně jako rozdíl v propustnosti membrán pro různé typy iontů, vytváří nehomogenní distribuci elektrického potenciálu v celém objemu [7].

1.5 Současný znalosti o elektroporace

Přesný mechanismus elektroporace je stále neznámý, i když je tento jev již používán v biotechnologii a medicíně. Jak již bylo uvedeno, předpokládá se, že ve dvouvrstvé lipidové membráně působené vysoko intenzivními elektrickými impulzy dochází k lokální reverzibilní restrukturalizaci její struktury, což vede k vzniku průtokového kanálu. Jsou možné dvě hlavní konfigurace pórů: hydrofilní a hydrofobní. V hydrofilních pórech jsou stěny tvořeny fosfolipidovými "hlavami" a v hydrofobních pórech-lipidovými "ocasy". Na malých poloměrech jsou hydrofobní póry energeticky příznivé a ve velkých poloměrech-hydrofilní. V závislosti na parametrech elektrického impulsu může být dynamika vytvořených pórů různá. Je důležité, aby póry v membránách živé tkáně mohly zmizet relativně rychle po ukončení fyzického faktoru. Zároveň existují póry, jak ukázaly studie, dostatečné pro zvýšení penetrace potřebných léků nebo terapeutických biologických látek do buněk.

V závislosti na parametrech fyzikálního faktoru způsobuje metoda dočasnou nebo nevratnou tvorbu pórů a zvýšení permeability buněčné membrány, doprovázené různými změnami v buňce, až do její smrti. Elektroporace se již používá v biotechnologii a medicíně. V souladu se známými mechanismy působení elektroporace a technických schopností je metoda stále nejrozšířenější v onkologii, dermatologii a kosmetologii. Elektroporace by měla být aktivněji studována, vyvíjena a používána fyzioterapeuty pro nervové, vnitřní, kožní a jiné nemoci.

2 ELEKTROPORAČNÍ ZAŘÍZENÍ— SOUČASNÝ STAV TECHNIKY

V mnoha zemích se vyrábějí přístroje pro elektroporaci s různým účelem. Nejpočetnější skupina se skládá ze zařízení určených k použití v kosmetologii a dermatologii. Většina z zařízení určených k použití v kosmetologii jsou kombinace, které společně s elektroporací zajišťují ultraphonoforézu, masáž, kryoterapii, oxygenoterapii, peeling atd.

Je známa řada zařízení pro elektroporaci, které se používají v biotechnologii a onkologii: systémy NanoKnife a Genetronics (USA), Cliniporator (1-5000 Hz, 100-1000 V, 100 μ s, Itálie). Pro zařízení jsou navržena velká řada konfigurací elektrod široce používaný v lékařském výzkumu.

2.1 Laboratorní zařízení pro elektroporaci a sonoporaci buněčných kultur.

Autoři pro zvýšení účinnosti propustnosti buňky a životaschopnost navrhli zařízení, které zajišťuje řízené kombinované působení pulzním elektrickým polem (napětí od 1 do 7 kV / cm) a akustickým vlnám (amplituda do 100 MPa).

Zařízení má princip konstrukce bloku (Obr. 2-1) a skládá se ze tří funkčně nezávislých zařízení:

- 1) sonoporátor rázové vlny;
- 2) elektroporátor rozsahu milisekund;
- 3) vysokonapěťový elektroporátor rozsahu sub-mikrosekund.



Obr.2-1 Laboratorní zařízení [2]

2.2 Zařízení pro elektroporaci buněk Ruské akademie věd

Ústav biologické instrumentace Ruské akademie věd vyvinul zařízení pro elektroporaci buněk používaných v buněčné technice, biotechnologii a biologii. Elektroporátor se skládá ze dvou elektricky připojených jednotek - řídicí jednotky a kamery. Řídicí jednotka generuje elektrické signály nezbytné pro proces elektroporace. Jediný impuls nebo řada impulsů jsou generovány ve dvou rozmezích. V 1. rozsahu je amplituda pulsů od 100 do 500 V po dobu 300 μ s až 99 ms. Ve 2. rozsahu - od 500 do 3000 V s trváním od 5 do 99 μ s. Počet impulsů v sérii je od 1 do 99. Po ukončení série impulsů je slyšet zvuk. Komora je vyrobena na standardní Petriho misce o průměru 90 mm. Elektrody z nerezavějící oceli poskytují největší jednotnost elektrického pole. Vzdálenost mezi elektrodami lze měnit v krocích po 2 mm. Zajištění úplné bezpečnosti při úrazu elektrickým proudem. Byly provedeny vzorky zařízení a byly provedeny zkoušky shody se specifikacemi.

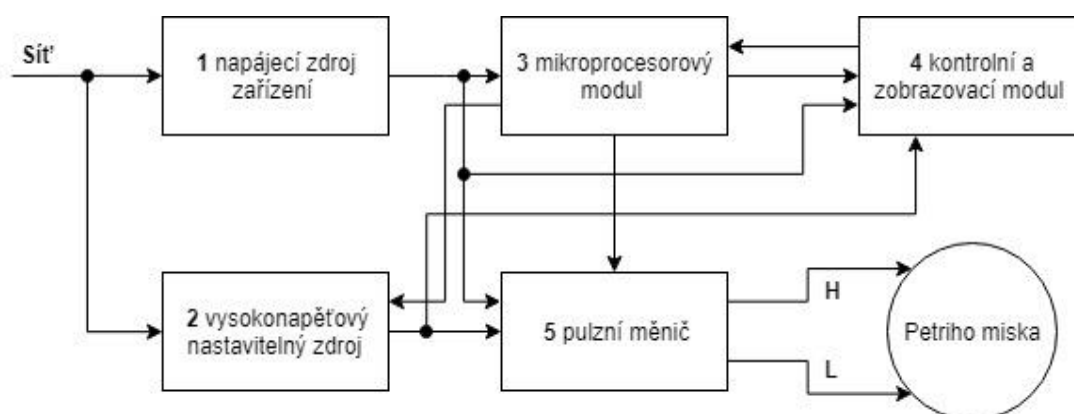
2.2.1 Stručný popis přístroje

Elektroporátor se skládá ze dvou strukturálně nezávislých elektricky připojených částí - regulátoru a kamery. (obr. 2-2)



Obr. 2-2 Elektroporátor [2]

Regulátor obsahuje 5 modulů: napájecí zdroj zařízení 1, vysokonapěťový nastavitelný zdroj 2, mikroprocesorový modul 3, kontrolní a zobrazovací modul 4 a pulzní měnič 5. (obr. 2-3)



Obr. 2-3 Bloková schéma elektroporátora

Modul 1 je napájen ze sítě 220 V, 50 Hz a generuje všechna napětí pro moduly 3, 4 a 5. Modul 2 je navržen tak, aby produkoval vysoká elektroporační napětí, která je plynule nastavitelná od 50 do 3000 V při maximálním výkonu až 200 VA.

Vzhledem k tomu, že doba trvání poměrně nízkého napětí impulzů (do 500 V) musí být výrazně delší než doba vysokého napětí (od 500 do 3000 V), zajišťujeme v přístroji dva výstupy do tavné komory - vysokonapěťové H a nízkonapěťové L. Mikroprocesorový modul 3 je řízen mikrokontrolérem Atmega a generuje všechny potřebné trvání výstupních impulzů, jejich počet a pauzu mezi nimi a měří jejich amplitudu a zobrazuje všechny tyto informace na LCD modulu 4. Všechna nezbytná nastavení modulu 3 jsou nastavena pomocí ovládacích tlačítek modulu 4.

Pulzní měnič 5 generuje elektrické signály potřebné pro proces elektroporace: jeden impuls nebo řadu impulzů ve dvou rozmezích. V 1. rozsahu je amplituda pulsů od 100 do 500 V s trváním 300 μ s až 99 ms - výstup L. Ve 2. rozsahu je amplituda impulzů od 500 do 3000 V s dobou trvání 5 až 99 μ s je výstup H. Počet impulzů je od 1 do 99. Po ukončení série impulzů je slyšet zvuk. Výstupní stavy modulu jsou realizovány na vysokonapěťových tranzistorech s vysokým výkonem MOSFET. Komora pro elektroporaci (obr. 2-2) je vyrobena na standardní skleněné Petriho misce o průměru 90 mm. Elektrody vyrobené z nerezové oceli jsou sestaveny tak, aby byla zajištěna co největší rovnoměrnost elektrického pole. Vzdálenost mezi elektrodami lze měnit v krocích po 2 mm. Zajištění úplné bezpečnosti při úrazu elektrickým proudem.

3 SYSTÉM PRO ELEKTROPORACI BUNĚK STŘÍDAVÝM NAPĚTÍM

Specifikace systému pro elektroporaci

Experimentální elektroporační generátor musí splňovat tyto požadavky:

- Výstupní napětí nastavitelné minimálně v rozsahu 0 – 1500 V
- Výstupní proud minimálně 12 A
- Výstupní frekvence nastavitelná minimálně v rozsahu 70 až 470 kHz
- Délka elektroporačního pulsu nastavitelná minimálně v rozsahu 0 až 150 μ s
- Mezera mezi pulsy nastavitelná v minimálním rozsahu 0,1 až 1,5 s
- Výstupní napětí generátoru musí být galvanicky odděleno od sítě
- Napájení ze sítě 230 V, 50 Hz

Generátor musí obsahovat tyto podpůrné vstupy a výstupy:

- vstup pro synchronizaci s EKG
- výstup pro připojení osciloskopu určený k zobrazení výstupního proudu zdroje
- výstup pro připojení osciloskopu určený k zobrazení intervalu mezi řídicím impulsem a elektroporačním impulsem

Generátor může být sestaven z libovolného počtu samostatných komponent, které společně zajišťují požadované funkce.

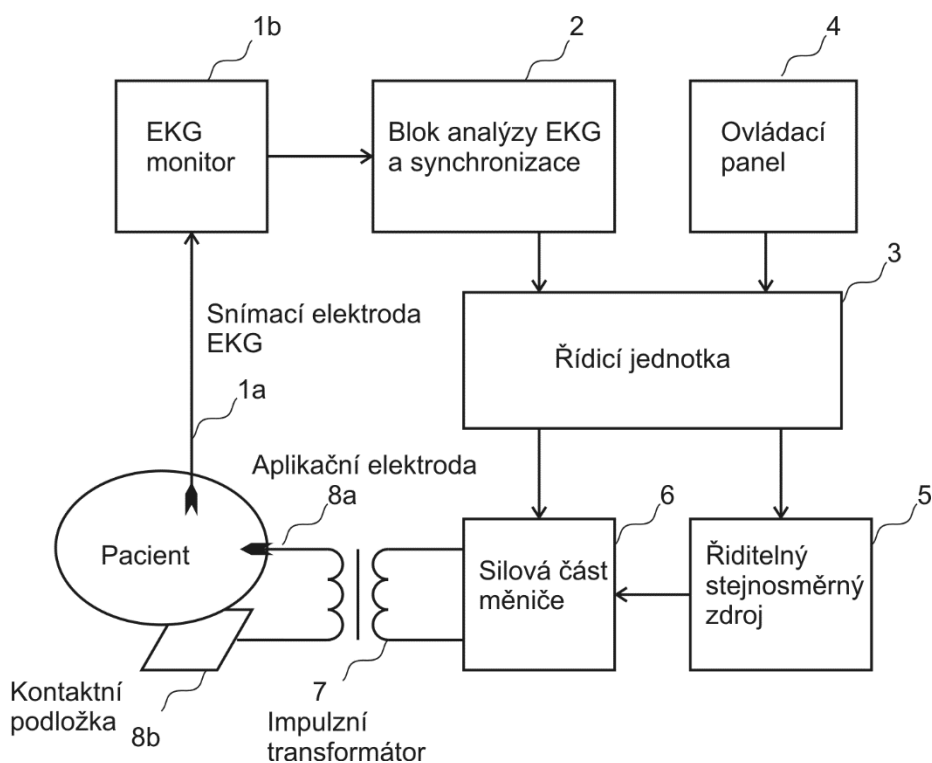
Generátor bude určen pouze pro experimentální provoz v laboratoři a bude instalován a obsluhován výhradně osobami znalými dle § 5 a vyšší, vyhlášky ČÚBP a ČBÚ č. 50/1978 Sb., a nemusí tedy splňovat podmínky bezpečnosti před nebezpečným dotykovým napětím živých i neživých částí.

3.1 Pracovní principy a konstrukce systému.

V této kapitole budou rozebrány základní pracovní principy systému a jeho konstrukce. Tento přístroj je určen pro provádění vratné a nevratné elektroporace.

Přístroj se skládá z 6 částí:

- Blok analýzy EKG a synchronizace
- Ovládací panel
- Řídicí jednotka
- Řiditelný stejnosměrný zdroj
- Silová část měniče
- Impulzní transformátor



Obr. 3-1 Blokové schéma systému

Přístroj umožňuje pracovat ve dvou režimech:

- Auto
- Synchronizace s EKG signálem

V režimu *Auto* je perioda (doba mezery) mezi impulsy nastavena manuálně pomocí potenciometru. Pokud zvolíme režim synchronizace s EKG, periodou bude puls pacienta. Jestliže elektroporační terapie bude prováděna bez synchronizace pulsu, pacientovi hrozí arytmie.

Na ovládacím panelu jsou umístěné potenciometry, kterými nastavujeme průběh elektroporačních impulsů. Řídicí jednotka generuje potřebné impulsy, které se přivádějí na budicí transformátor. Transformátor budí 4 vysokonapěťové tranzistory MOSFET, které se nacházejí na silové části měniče. Pomocí říditelného stejnosměrného zdroje nastavujeme velikost amplitudy vysokofrekvenčního impulsu. Dále impulsy prochází impulzním transformátorem, na jehož sekundárních svorkách je připojená kontaktní podložka a aplikační elektroda, která přenáší elektroporační impuls do tkáně pacienta.

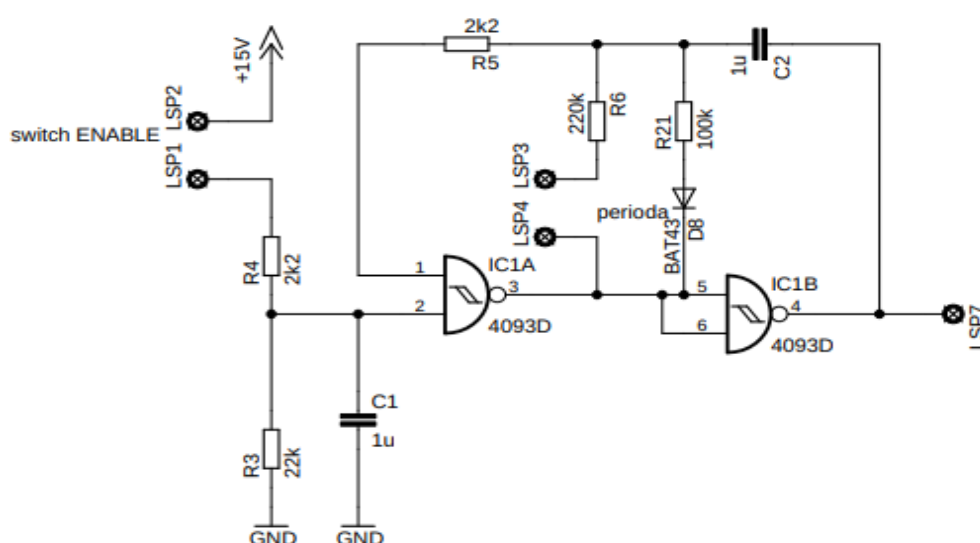
3.2 Řídicí jednotka

Hlavním úkolem bylo fyzicky realizovat úpravy elektroporačního generátoru diskutované v semestrálním projektu. Na začátku byla řídicí deska upravená elektronicky, pomocí programu EAGLE (Easily Applicable Graphical Layout Editor). Následně byla deska vytištěna a vyleptána. Deska je dvoustranná, přičemž na horní straně je obvod, který je sestaven z napájených SMD součástek (obr.3-2), dolní stranu pak tvoří celoplošná zem. V dalších podkapitolách lze nalézt popis logiky a konstrukci jednotlivých částí řídicí desky (obr.3-3).

3.2.1 Generátor periody pulsu

Převažující část logického obvodu je vytvořena za pomoci Schmidtových klopných obvodů. Schmidtův KO je dvupolohový reléový (spínací) prvek, jehož statická charakteristika je ve tvaru hysterezní smyčky. Nejjednodušší realizace Schmidtova KO je na digitálních logických prvcích. Při použití Schmidtova KO jako analogového invertujícího zesilovače jsou dva logické inventory zapojené do série, čímž se vytvoří analogový jednosměrný komparátor s prahem spínání přibližně poloviny napájecího napětí.

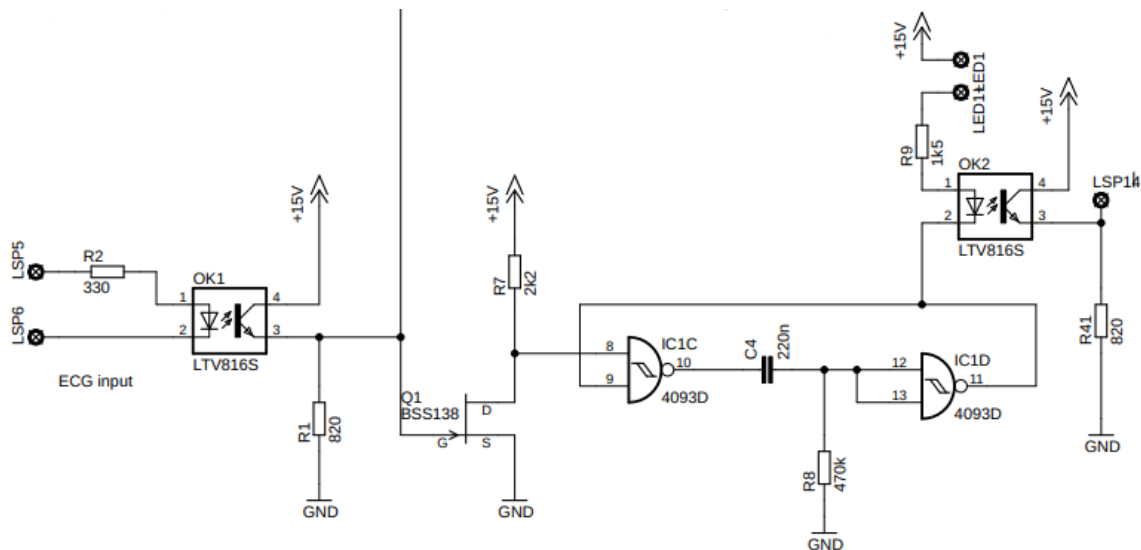
Pro zajištění stabilních signálových vln je nutné přivést prvek do oblasti mezi "0" a "1". Dále je nutné zajistit kladnou zpětnou vazbu prostřednictvím kondenzátoru C2. Invertor generuje signál, který nabíjí a vybíjí kondenzátor. To funguje, protože na výstupu invertoru je „0“ nebo „1“ (nízké nebo vysoké prahové hodnoty). V případě, že je na výstupu 0 V, je výstupní napětí na kondenzátoru vyšší než na výstupu invertoru, kondenzátor se začne vybíjet přes odpor R6 až do poklesu napětí na prahovou hodnotu invertoru. Kondenzátor se vybíjí, dokud není signál na vstupu invertoru dostatečně nízký. Při překročení prahové hodnoty se cyklus restartuje. Pomocí potenciometru, které je připojen na vývody LSP3-4, nastavujeme periodu v rozmezí 0,4 až 1,8 s.



Obr. 3-4 Generátor periody pulsu

3.2.2 Synchronizace s EKG a zobrazení intervalu mezi řídicím impulsem a elektroporačním impulsem.

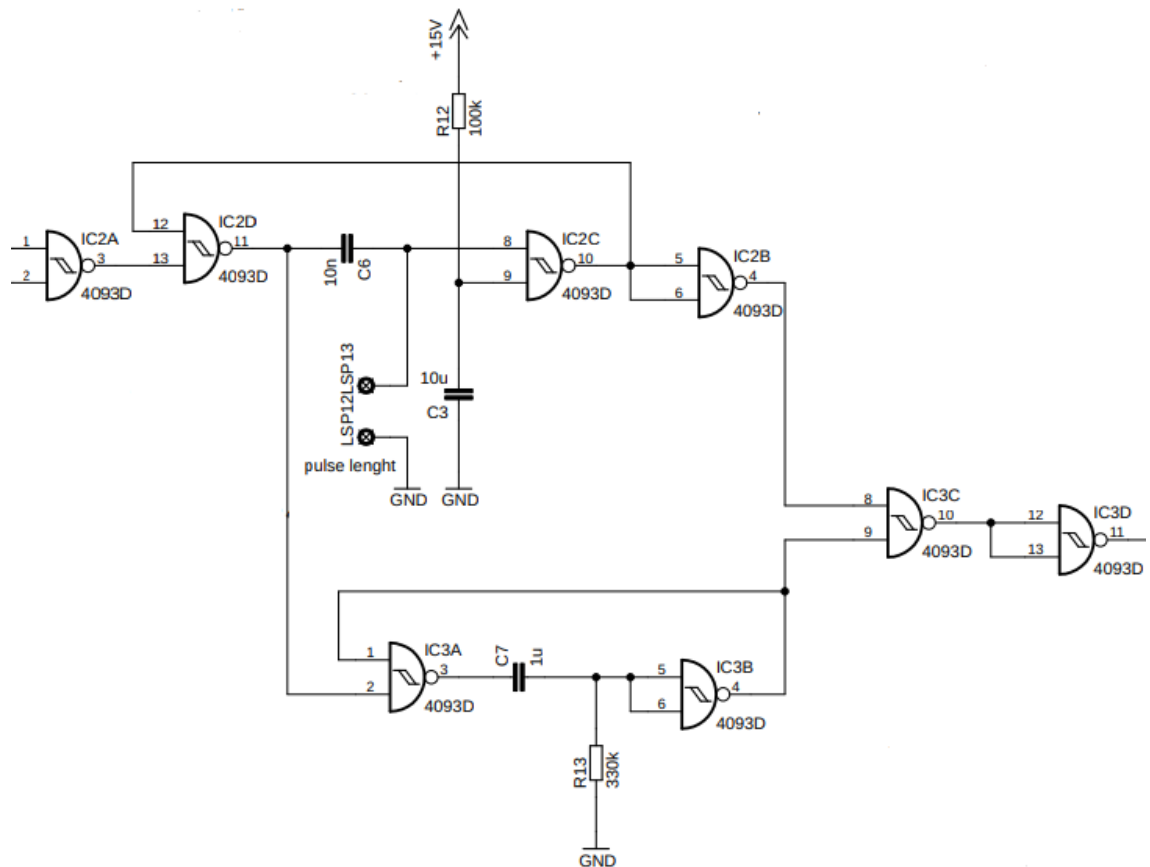
Protože tvar pulsu EKG neumňuje přímo pracovat s logickými obvody, pro změnu tvaru a délky pulsu byl použit optočlen OK1. Signál s periodou shodnou s pulsem pacienta je přiváděn na generátor délky pulsu, čímž dochází k otvírání tranzistoru Q1, který je spojen s prodlužovačem délky pulsu. Prodlužovač se skládá ze dvou sériově zapojených invertorů, kondenzátoru C4 a rezistoru R8, jehož velikostí je nastavována délka pulsu. Pro zobrazení intervalu na osciloskopu musí být signál prodloužen na hodnotu 100 ms. Když se na výstupu invertoru IC1D objeví logická 0, v optočlenu OK2 se rozsvítí dioda, která otevře fototranzistor, z jehož emitoru postupuje signál na vývod LSP14. Tento vývod je výstupem umožňující zobrazení signálu na osciloskopu. Pro lepší názornost je použita LED1(zelená), která se rozsvítí v intervalu mezi řídicím impulsem a elektroporačním impulsem.



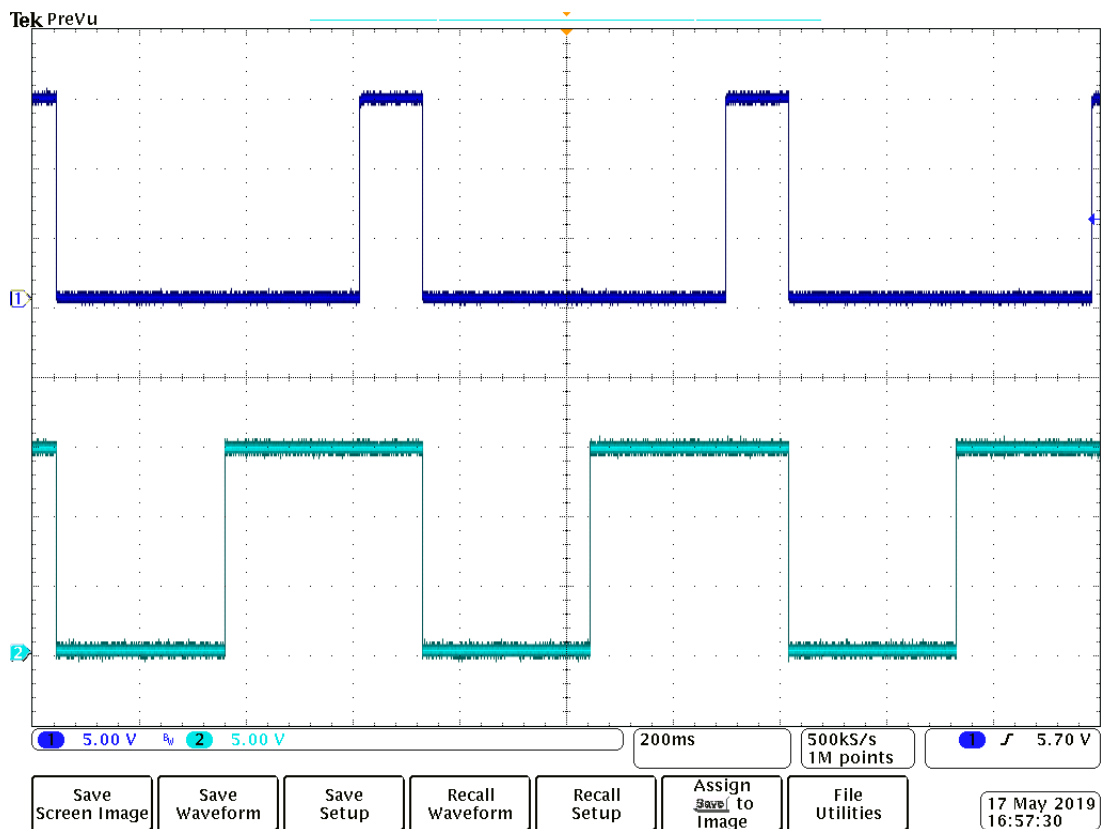
Obr. 3-5 Obvod pro synchronizaci s EKG

3.2.3 Generátor délky pulzu

Generátor délky pulsu se skládá ze dvou hlavních částí. První část je nastavitelná a umnožuje nastavovat délku pulzu v rozmezí 0 až 150μs pomocí potenciometru, který je připojen na vývody LSP12-13. Druhá část generátoru je omezovač délky pulzu, který je spouštěn sestupnou hranou pulzu generátoru periody nebo EKG. Impulzy z dvou částí pokračují na vstupy 8-9 klopného obvodu IC3C (obr.3-7). Impulz určité délky a periody pokračuje do klopného obvodu D.



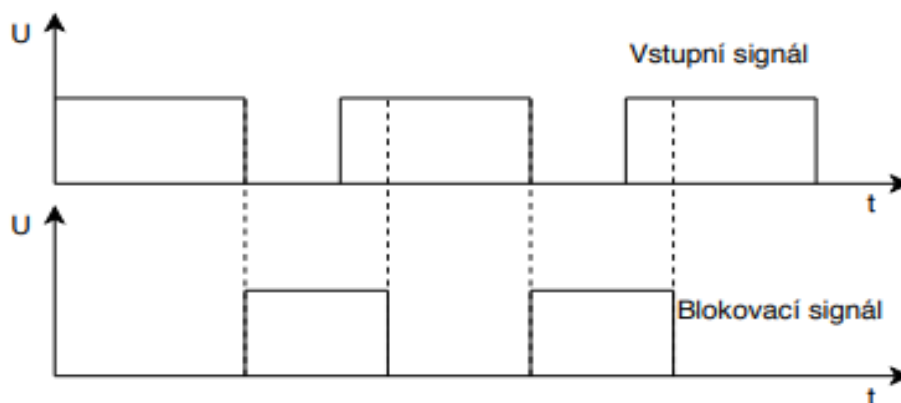
Obr. 3-6 Generátor délky pulzu



Obr. 3-7 Impulzy na vstupech 8-9 klopného obvodu IC3C

Při oživení desky byl zjištěn problém, který spočívá v tom, že při nastavení periody nižší než 600 ms je šířka vstupního signálu příliš velká pro omezovač délky pulzu. Blokovací signál překrývá vstupní, proto se na výstupu objevuje logická 0 (obr.3-8).

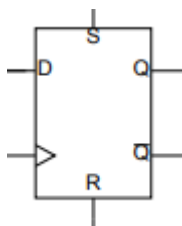
Pro řešení tohoto problému, bez závažných změn v logice obvodu, existují dvě varianty. První je zmenšení doby blokování změnou hodnoty odporu rezistoru R13 (obr.3-6). Tato varianta byla odmítnuta, jelikož v režimu synchronizace s EKG by mohlo dojít k překročení délky elektroporačního impulzu. Druhou možností je pak zkrátit délku vstupního signálu. V generátoru periody byl použit RD článek, který je připojen paralelně k rezistoru R6 (obr. 3-4).



Obr. 3-8 Průběh vstupního a blokovacího signálu

3.2.4 Klopný obvod D, nadproudová ochrana a měření proudu

Klopný obvod D si pamatuje stav vstupu a dává jej na výstup. Klopný obvod D má alespoň dva vstupy: informační D a synchronizační C. Synchronizační vstup C může být statický (potenciální) a dynamický. U klopného obvodu D se statickým vstupem C se informace zaznamenávají v době, kdy je úroveň signálu $C = 1$. U klopného obvodu D s dynamickým vstupem C jsou informace zaznamenávány pouze při poklesu napětí na vstupu C. Dynamický vstup je v schématech znázorněn jako trojúhelník. Pokud vrchol trojúhelníku směřuje k čipu (přímý dynamický vstup), klopný obvod je spouštěn náběžnou hranou pulzu. Pokud vrchol směřuje z čipu (inverzní dynamický vstup), klopný obvod je spouštěn sestupnou hranou pulzu. V takovém klopném obvodu může být informace na výstupu zpožděna o jeden cyklus vzhledem ke vstupní informaci, protože informace na výstupu zůstává nezměněna až do příchodu dalšího synchronizačního impulsu.

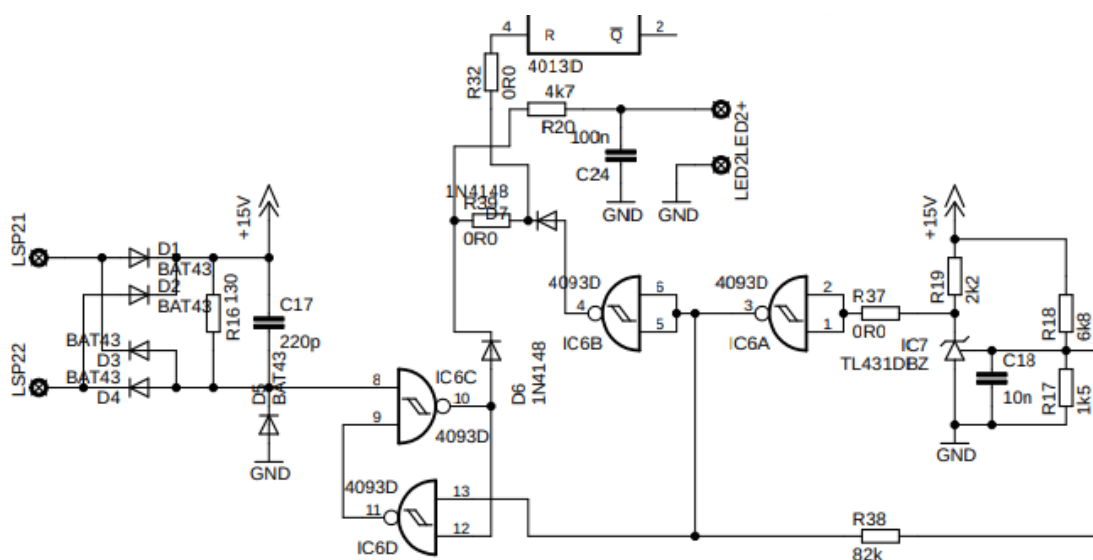


Obr. 3-9 Klopný obvod D

V našem případě vstup D je spojen s generátorem délky pulzu. Vstup C je spojen s generátorem vysokofrekvenčního napětí. Impulz z výstupu Q jde na zesilovač signálu.

Vstup S je připojen na GND (logická 0). Vstup R je spojen s nadproudovou ochranou (obr. 3-10) a je ve stavu logické 0. Z toho vyplývá, že na výstupu Q je logická 1. Jakmile ochrana vyhodnotí pokles napětí pod dovolenou hodnotu, pošle na klopný obvod D logickou 1, v tento okamžik se na výstupu Q objeví logická 0 a elektroporační impulzy se zastaví. Také se rozsvítí LED2 (červená), která signalizuje nadproud v systému.

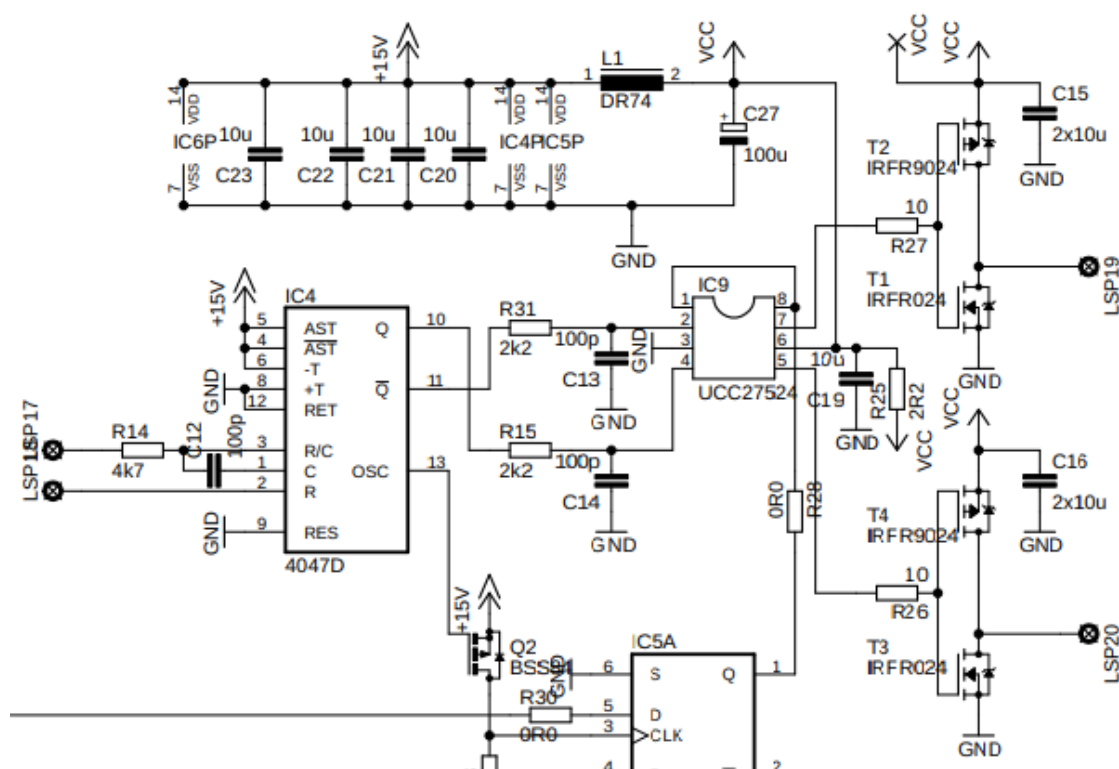
Na vývody LSP21-22 je připojen proudový transformátor, pomocí kterého měříme proud.



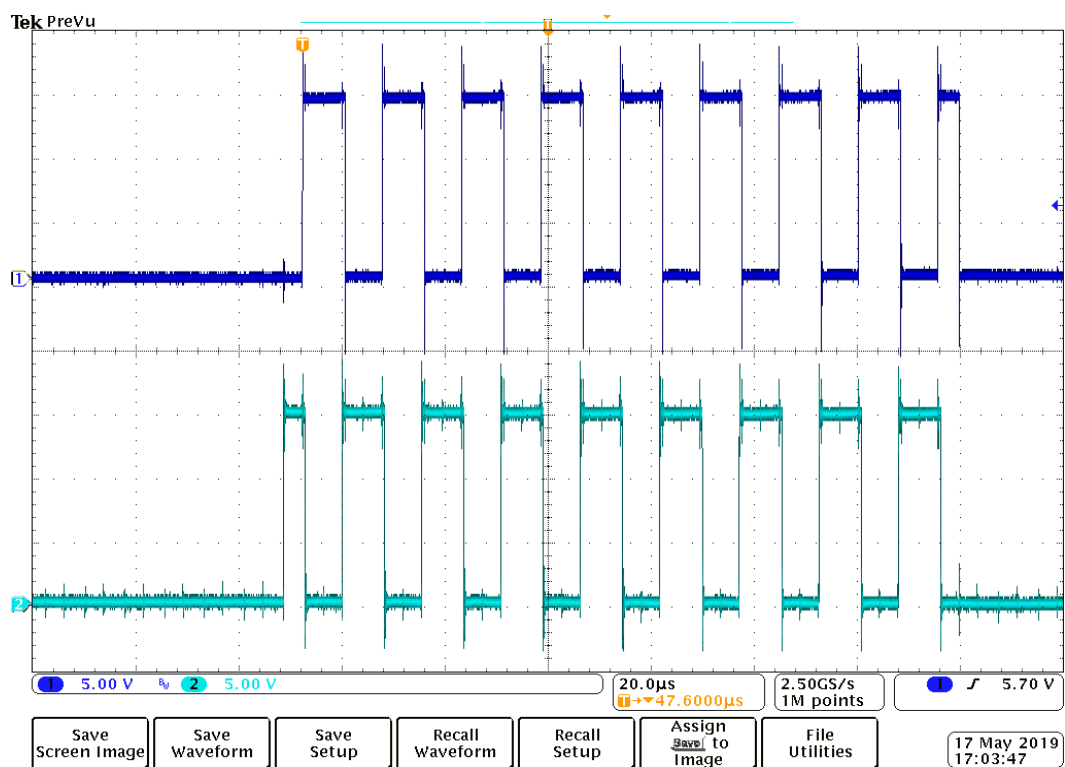
Obr. 3-10 Nadproudová ochrana

3.2.5 Generátor periody vysokofrekvenčního napětí

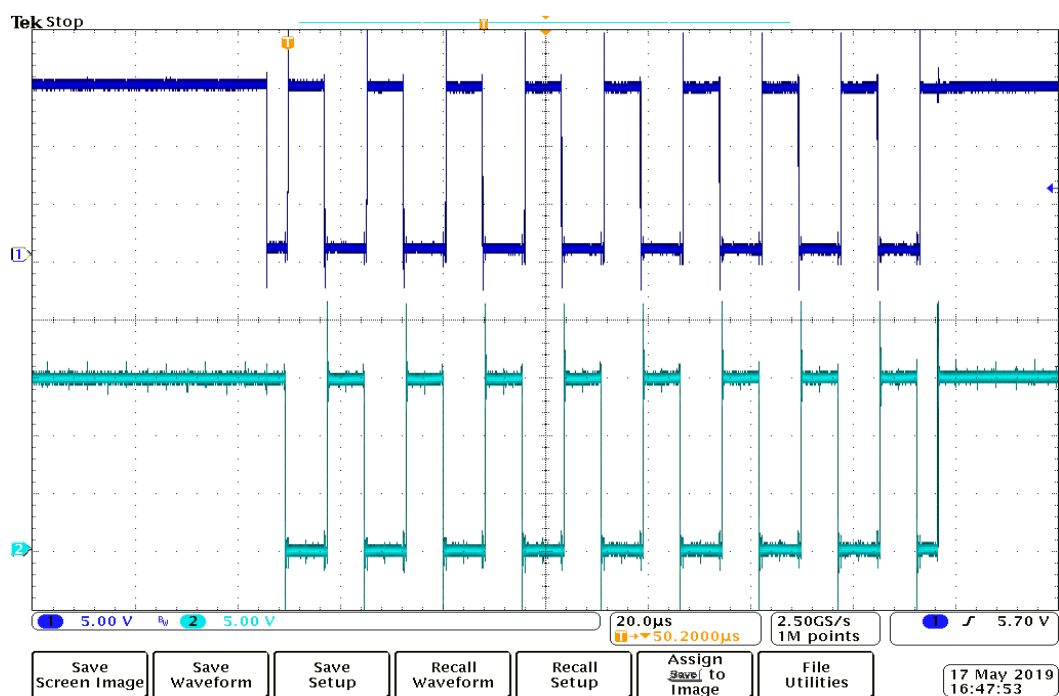
Generátorem periody vysokofrekvenčního napětí je multivibrátor IC4. Pomocí potenciometru, připojeného na vývody LSP17-18, nastavujeme frekvenci v rozmezí 70 až 470 kHz. Vysokofrekvenční impulzy jsou přiváděné na zesilovač signálu IC9, kde se skládají se signálem z klopného obvodu D. Výstupní impulzy ze zesilovače mají tvar dle obr.3-12. Tyto impulzy budí spínací tranzistory T1-4, které posílají obrácené impulzy (obr.3-13) na primární vinutí budicího transformátoru, který je připojen na vývody LSP19-20. Transformátor budí 4 vysokonapěťové tranzistory MOSFET, které se nachází na silové části měniče.



Obr. 3-11 Generátor periody vysokofrekvenčního napětí a zesilovač signálu



Obr. 3-12 Výstupní impulzy ze zesilovače signálu

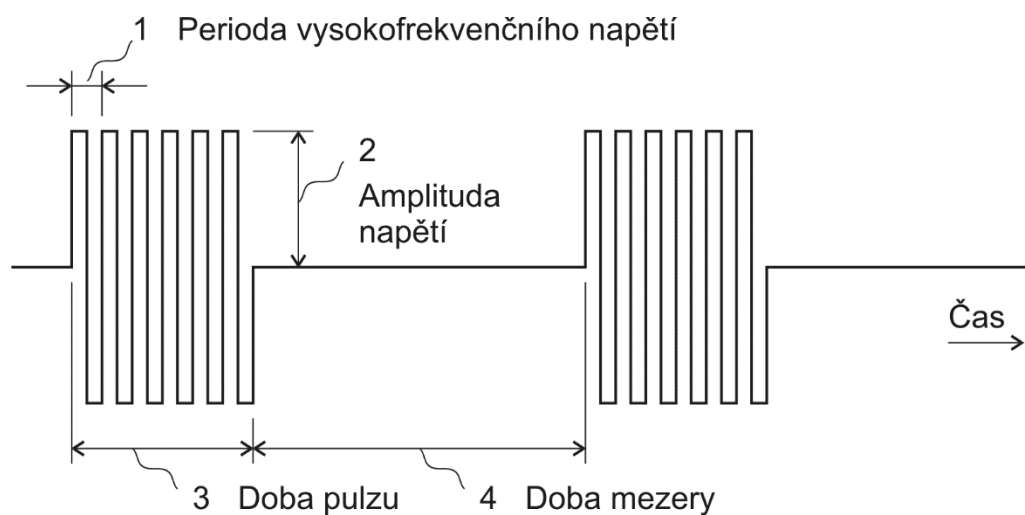


Obr. 3-13 Výstupní impulzy na vývodech LSP19-20

3.3 Návod k použití

Hlavní vypínačem se přístroj zapne. Výstupní průběh se skládá ze sérií impulzů. Každý impulz je tvořen střídavým napětím, jehož frekvence je nastavena pomocí červeného potenciometru (70-470kHz). Napětí (0-1,500 V) se nastavuje černým potenciometrem a výstupní hodnota se zobrazuje na obrazovce. Délka každého impulsu (40-150 μ s) je nastavována modrým potenciometrem. Perioda mezi dávkami (0,4-1,8 s) je nastavována bílým potenciometrem. Když jsou nastaveny všechny požadované hodnoty, může být série impulzů spuštěna červeným přepínačem do polohy AUTO. V případě synchronizace s EKG musí být přepínač v poloze EKG.

Zařízení je vybaveno nadproudovou ochranou, která je nastavena na 12 A. Pokud proud dosáhne této prahové hodnoty, série impulzů se zastaví, rozsvítí se červená LED dioda a přístroj přejde do chybového režimu. Hlavní vypínač umožňuje resetovat chybový režim.



Obr. 3-14 Průběh elektroporačního impulsu

ZÁVĚR

Cílem bakalářské práce bylo se seznámit se základnou teorií o elektroporace, současným stavem techniky, fyzicky realizovat úpravy elektroporačního generátoru diskutované v semestrálním projektu, oživit zařízení a zpracovat přehledný návod k použití.

V průběhu psaní bakalářské práce, byla zjištěna důležitá informace o chování živých buněk v elektrickém poli, závislosti elektroporačních účinku na době a velikosti impulsu.

Na základě dvou starších verzí řídicích desek s úpravami byla fyzicky realizována nová řídicí deska. Při oživení desky byl zjištěn problém s blokovacím signálem omezovače délky pulsu. Řešení tohoto problému je uvedeno v podkapitole 3.2.3. Jinak deska je hotová a může být připojena k systému, ale bylo rozhodnuto, že tato deska bude použita v nové verzi přístroje.

Literatura

- [1] Watanabe H, Nagoshi T, Suzuki S, Kobayashi M, Usa M, Inaba H. Chemiluminescence in the crude extracts of soybean seedlings. Postulated mechanism on the formation of hydroperoxide intermediates. *Biochim Biophys Acta*. 1992;1117(2):107-113. Dostupné na URL:
< <https://eurekamag.com/pdf/002/002321946.pdf> >
- [2] Mescherskiy M.E., Kaaba S.I., Sokolovskaya A.A., Moskovtsev A.A., Blohin D.Yu., Andriyanov Yu.V., Kubatiev A.A. Novyi metod kombinirovannoy elektroporatsii i sonoporatsii so snizhennyim stress-indutsiruyuschim deystviem na kletki. *Patogenez*. 2012;10(2):59-67. Dostupné na URL:
< http://niiopp.ru/netcat_files/206/124/h_1ebc1d2d5c4473e3ee7aa5af8599ed2b >
- [3] Rabussay D, Widera G. Electroporation therapy. *Electroporation Mediated Drug*. 2002;2(3):34-40.
- [4] Moroz V.V., Bogushevich M.S., Chernyish A.M., Kozlova E.K., Sharakshane A.S. Eksperimentalnoe issledovanie deystviya defibrilliruyuschiy impulsov raznoy formy na biologicheskie membrany. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny*. 2004;137(2):140-144.
- [5] Lombry E, Dujardin N, Preat V. Transdermal delivery of macromolecules using skin electroporation. *Pharm Res*. 2000;17(1):32-37. Dostupné na URL:
<http://www.farg.ucl.ac.be/articles%20pdf/Articles%202000/Lombry-pharm.res-2000.pdf>
- [6] Antonov V.F. *Lipidnyie poryi: stabilnost i pronitsaemost membran*. *Sorosovskiy obrazovatelnyy zhurnal*. 1998;(10):10-17. Dostupné na URL:
http://www.pereplet.ru/nauka/Soros/pdf/9810_010.pdf
- [7] Chernyish A. M. *Biomehanika neodnorodnostey serdechnoy myishtsy*. — M., 1993.

Osazovací místa

Seznam příloh

Příloha 1 - Celková schémata řídicí desky.....	42
Příloha 2 - Osazovací místa.....	43
Příloha 3- Verze desky pro tištění	44

